

**PCT**ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12Q 1/68, G01N 33/50</b>	<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/28499</b> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>10. Juni 1999 (10.06.99)</b>
---	-----------	--

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP98/07682**(22) Internationales Anmeldedatum: **27. November 1998  
(27.11.98)**(30) Prioritätsdaten:  
197 52 922.4 28. November 1997 (28.11.97) DE  
198 05 229.4 10. Februar 1998 (10.02.98) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):  
**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL  
GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am  
Rhein (DE).**

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **STEINLEIN, Peter [DE/AT];  
Rembrandtstrasse 10/4, A-1020 Wien (AT). HOPPMANN,  
Johannes [AT/AT]; Anton-Frank-Gasse 3/9, A-1180  
Wien (AT). LAMM, Gabor [HU/DE]; Hohenzollernstrasse  
120, D-80796 München (DE). CHRISTOFORI, Gerhard  
[DE/AT]; August-Greimlweg 17, A-1230 Wien (AT).**(74) Gemeinsamer Vertreter: **BOEHRINGER INGELHEIM IN-  
TERNATIONAL GMBH; Postfach 200, D-55216 Ingel-  
heim am Rhein (DE).**(81) Bestimmungsstaaten: **CA, JP, MX, US, europäisches Patent  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE).****Veröffentlicht***Mit internationalem Recherchenbericht.  
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen  
eintreffen.*(54) Title: **METHOD FOR MEASURING THE APOPTOSIS**(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR MESSUNG DER APOPTOSE****(57) Abstract**

The invention relates to a method for quickly and easily measuring the apoptosis. Mammal cells are co-transfected with a plasmid coded for a fluorescent protein, and with a plasmid carrying an interested gene. The apoptosis is measured after incubation and mild fixation in which the DNA content of the cells is determined by means of DNA-binding colorants, and the portion of the transfected cells is determined by means of flow-through cytometry. The method can be used in order to identify substances which modulate the proapoptotic or antiapoptotic effect of genes or gene products.

**(57) Zusammenfassung**

Verfahren zur raschen und einfachen Messung der Apoptose. Säugetierzellen werden co-transfiziert mit einem Plasmid, das für ein fluoreszierendes Protein kodiert, und mit einem Plasmid, das ein interessierendes Gen trägt. Nach Inkubation und milder Fixierung wird die Apoptose gemessen, indem mittels DNA-bindendem Farbstoff der DNA-Gehalt der Zellen sowie mittels Durchflußzytometrie der Anteil der transfizierten Zellen bestimmt wird. Das Verfahren kann verwendet werden, um Substanzen zu identifizieren, die die pro- oder antiapoptotische Wirkung von Genen oder Genprodukten modulieren.

**BEST AVAILABLE COPY**

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
RE	Reinland						

## Verfahren zur Messung der Apoptose

Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet biologischer Testmethoden.

Die Apoptose oder der programmierte Zelltod ("programmed cell death", PCD) ist ein genetisch gesteuerter zellulärer Selbstmordmechanismus zur selektiven Aussonderung unerwünschter Zellen (1-4). PCD ist in einer Vielzahl biologischer Prozesse, einschließlich der Embryonal- und der Neural-Entwicklung, der Regulierung des Immunsystems, der Organogenese, der Gewebshomöostase und der Verhinderung von Erkrankungen wie Tumorwachstum und Virusinfektion, ein unbedingt erforderlicher Prozeß. Apoptose ist gekennzeichnet durch Blasenbildung der Plasmamembran, Schrumpfen der Zellen, Kondensation des Kerns, endonukleolytische Spaltung von genomischer DNA in Fragmente internukleosomaler Länge sowie Ausbildung apoptotischer Körper.

Die zur Zeit verfügbaren Methoden zur Untersuchung der Apoptose beruhen auf der Beurteilung morphologischer Veränderungen auf zellulärer Ebene mittels Licht-, Elektronen- oder Zeitraffer-Mikroskopie in Verbindung mit Fluoreszenz-Vitalfarbstoffen, der Verwendung von Annexin V, mittels dem der Verlust der Membranphospholipid-Assymetrie während der Apoptose verfolgt werden kann (7), oder bestehen in Assays zum Nachweis der DNA-Fragmentierung mittels Gelelektrophorese (8) oder mittels in situ Markierung von DNA-Strangbrüchen („nick-end-Markierung“) (TUNEL) (9).

Um die Wirkung von Genen, die eine Rolle bei der Apoptose spielen, mittels transienter Transfektions-Analysen zu untersuchen, sind jedoch die meisten dieser Methoden entweder ungeeignet oder, im Fall der TUNEL-Methode, zu teuer und zu aufwendig.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein neues Verfahren zur Messung der Apoptose bereitzustellen, das die Nachteile der bekannten Methoden beseitigt.

Diese Aufgabe wurde durch ein Verfahren für die Messung der Apoptose gelöst, welches dadurch gekennzeichnet ist,

- A) daß man eine Population von Säugetierzellen transient transfiziert
    - ai) mit einem Plasmid, enthaltend eine interessierende DNA-Sequenz, von der bestimmt werden soll, ob sie bzw. das davon exprimierte Polypeptid eine pro- oder anti-apoptotische Wirkung hat,
    - aii) oder mit einem Plasmid, enthaltend eine interessierende DNA-Sequenz, von der bestimmt werden soll, ob bzw. durch welche Substanzen ihre pro- oder anti-apoptotische Wirkung bzw. die Wirkung des davon exprimierten Polypeptids modulierbar ist,
  - b) und mit einem Plasmid, enthaltend eine für ein fluoreszierendes Markerprotein kodierende DNA,
- B) daß man die Zellen in einem geeigneten Nährmedium, gegebenenfalls in Gegenwart einer Testsubstanz,

solange inkubiert, bis die interessierende DNA-Sequenz bzw. das exprimierte Polypeptid seine potentielle Wirkung auf die Apoptose ausgeübt hat,

- C) daß man die Zellen erntet und fixiert, so daß das fluoreszierende Protein in den Zellen verbleibt, während die bei der Apoptose entstehenden DNA-Fragmente aus den Zellen diffundieren können,
- D) daß man mittels Messung des DNA-Gehalts den Anteil der apoptotischen Zellen bestimmt,
- E) daß man mittels Messung der Zellen mit fluoreszierendem Markerprotein den Anteil der transfizierten Zellen bestimmt,
- F) und daß man durch Vergleich der in Schritt D und E erhaltenen Werte den Anteil der apoptischen Zellen in der transfizierten Subpopulation der Zellen bestimmt.

Unter die Bezeichnung „interessierende DNA-Sequenz“ (im folgenden auch als „Apoptose-Testgen“ bezeichnet) fallen sämtliche DNA-Sequenzen, die als solche oder deren translatierte Produkte direkt oder indirekt Apoptose beeinflussen. Beispiele für Apoptose stimulierende Gene sind p53, bax, ElA, Beispiele für Apoptose hemmende Gene sind bcl-2, bcl-x, ElB 19K, zur letzteren Gruppe zählen auch die sog. Überlebensfaktoren wie Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (IGFs). Derartige Apoptosegene und ihre Wirkung wurden in Übersichtsartikeln beschrieben (z. B. 4, 23, 24).

Bei dem Apoptose-Testgen kann es sich um bekannte oder unbekannte Gene oder Fragmente davon handeln. Unter Beeinflussung der Apoptose werden sowohl Induktion und Verstärkung als auch Blockierung und Abschwächung der Apoptose verstanden.

Die erfindungsgemäße Methode erlaubt eine große Variabilität, z.B. hinsichtlich der für die Bestimmung der transfizierten Zellen bzw. für die Apoptose verwendeten Marker, hinsichtlich der Plasmide und der für die Transfektion der Zellen eingesetzten Transfektions-Methode.

Die erfindungsgemäße Methode weist als eines ihrer wesentlichen Elemente ein fluoreszierendes Markerprotein auf, das als Nachweis für die transiente Transfektion der Zellen dient.

Bevorzugt ist als Markerprotein das Green Fluorescent Protein (GFP). GFP-Mutanten, die im Hinblick auf die FACS-Analyse optimiert und für die Anwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet sind, sind literaturbekannt. Ein Beispiel für eine geeignete GFP-Mutante wurde in (10) beschrieben ("enhanced Green Fluorescent Protein", eGFP); es können jedoch im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch andere Mutanten verwendet werden, die die Bedingung erfüllen, daß sie den Zellmetabolismus nicht beeinflussen, daß sie intrazellulär lokalisiert bleiben und daß sie ein meßbares Fluoreszenzsignal liefern, insbesondere daß sie mittels derzeit gängiger fluoreszenzaktivierter Durchflußzytometrie-Methoden (Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS)) meßbar sind.

Außer dem Green Fluorescent Protein (GFP) können auch andere fluoreszierende Markerproteine verwendet werden.

Beispiele dafür sind Blue Fluorescent Protein (BFP) (26) und Yellow Fluorescent Protein (YFP) (25). Wesentlich für die Eignung eines Markerproteins für die Verwendung in der erfindungsgemäßen Methode sind die oben für GFP-Mutanten angeführten Eigenschaften.

Potentielle Markerproteine sowie Art und Menge der im Assay einzusetzenden dafür kodierenden Plasmide sowie die am besten geeignete Transfektionsmethode können z.B. wie folgt getestet werden: die für die Markerproteine kodierenden Plasmide werden transient in Säugerzellen transfiziert, zweckmäßig in dieselben Zellen und unter denselben Bedingungen, mit denen die erfindungsgemäße Methode durchgeführt werden soll. Die Eignung der transfizierten Markerproteine wird durch Meßreihen ermittelt, in denen Transfektionseffizienz und die Effizienz der reproduzierbaren Meßbarkeit durch FACS-Analyse bestimmt werden.

Als Marker für die Apoptose dient ein DNA-bindender Farbstoff, z.B. Propidiumjodid (PI), der in der apoptotischen Subpopulation eine Verringerung der Fluoreszenz herbeiführt (14-17). Diese Nachweisweismethode beruht auf dem Prinzip, daß die genomische DNA in Zellen während der Apoptose endonukleolytisch abgebaut wird. Die kleinen DNA-Fragmente diffundieren aus der Zelle; die Verringerung des DNA-Gehalts auf weniger als den doppelten Chromosomensatz ("sub-2N") ist ein Kennzeichen apoptotischer Zellen.

Die verringerte Fluoreszenz von PI in Zellen, die Apoptose durchmachen, resultiert im Erscheinen eines charakteristischen Fluoreszenzpeaks („sub-2N-Peak“) im Bereich der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Region des Zellzyklus.

Statt Propidium-Jodid können auch andere DNA-bindende Farbstoffe verwendet werden. Vertreter geeigneter Farbstoffe dieses Typs sind kommerziell erhältlich, z.B. DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol), Acridinorange, Ethidiumbromid. Der am besten geeignete Farbstoff kann ermittelt werden, indem Zellen zur Apoptose angeregt werden und anschließend mittels FACS- oder mikroskopischer Analyse ermittelt wird, ob Apoptose mit dem Farbstoff-Kandidaten reproduzierbar gemessen werden kann.

Einer der Vorteile der erfindungsgemäßen Methode besteht darin, daß die Messung der Fluoreszenz des Markerproteins und des DNA-Gehalts gleichzeitig erfolgen kann, vorzugsweise mittels FACS-Analyse. Geeignete Geräte sind im Handel erhältlich.

Die Erfindung ist auf sämtliche Säugerzellen anwendbar, die kultivierbar sind. Für den Fachmann ist es Routine, die handelsüblichen FACS-Geräte auf unterschiedliche Zelltypen einzustellen.

Für die Transfektion der Zellen mit Markergen einerseits und interessierendem Gen andererseits sind sämtliche Vektoren geeignet, die in Säugerzellen effizient und reproduzierbar Expression herbeiführen. Beispiele für die zahlreich zur Verfügung stehenden, auch kommerziell erhältlichen Vektoren, enthalten regulatorische Sequenzen mit der Fähigkeit, in einer Vielzahl von Säugerzellen hohe Expressionsraten zu erzielen. Beispiele sind Vektoren, die den CMV-(Cytomegalievirus), den SV40-(Simianvirus), MSV (Moloney Sarcoma Virus)-Promotor oder andere starke, zelltypenspezifische Promotoren enthalten.



Als Träger für Markergen und interessierendes Gen können identische oder verschiedene Vektoren verwendet werden; es kann in Abhängigkeit vom Zelltyp vorteilhaft sein, Vektoren mit unterschiedlichen Promotoren zu verwenden, um eine Konkurrenz der Promotoren bei der Transkription zu vermeiden.

Bezüglich der Transfektions-Methoden ist die Erfindung keinen Beschränkungen unterworfen; es können prinzipiell sämtliche für die transiente Transfektion von Säugetierzellen bekannten Methoden verwendet werden, z.B. Calciumphosphat, kommerziell erhältliche kationische Lipide wie Lipofectamin oder Transfectam, Methoden auf der Grundlage der rezeptorvermittelten, Adenovirus-unterstützten Endozytose, wie z.B. in der WO 93/07283 beschrieben, z.B. mittels Polyethylenimin und Psoralen/UV inaktiviertem Adenovirus, wie auch in (21) beschrieben. Die Transfektionsmethode kann mittels Reihenversuchen, in denen hinsichtlich Transfektionsbedingungen, Zelltyp, Nährmedium etc. variiert wird, optimiert werden, indem mit einem fluoreszierenden Markerprotein transfiziert und die Expression des Proteins mittels FACS-Analyse bestimmt wird. Die für das Markerprotein optimierten Bedingungen werden für die Co-Transfektion mit dem interessierenden Gen verwendet.

Im Anschluß an die Transfektion werden die Zellen in einem geeigneten Nährmedium, das an den jeweiligen Zelltyp angepaßt wird, inkubiert. Gegebenenfalls werden die Zellen zur Apoptose stimuliert, insbesondere wenn das Apoptose-Testgen auf eine Hemmung der Apoptose untersucht werden soll. Geeignete Apoptose Stimuli sind literaturbekannt und im Handel erhältlich, Beispiele dafür sind Staurosporin, Daunomycin, Etoposid. Die Inkubationsbedingungen sowie die Zweckmäßigkeit eines

Apoptose-Stimulans werden in Vorversuchen ermittelt. Wesentlich für die Inkubation, insbesondere für deren Dauer ist, daß Apoptose in einem Ausmaß stattgefunden hat, welches ermöglicht, daß eine Änderung meßtechnisch, z.B. mittels FACS-Analyse, erfaßt werden kann.

Wesentlich für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der anschließend an die Inkubation vorgenommene Fixierungsschritt.

Wesentliche Anforderung an die Fixierung ist, daß die Bedingungen so gewählt werden, daß die bei der Apoptose entstehenden, kleinen subgenomischen DNA-Fragmente (internukleosomale Fragmente, d.h. solche mit einer Größe von ca. 200 bp und einem Vielfachen davon) aus den apoptotischen Zellen diffundieren können, gleichzeitig aber das fluoreszierende Markerprotein in der Zelle verbleibt. Bei den bisher verfügbaren Methoden war die Kombination dieser Messungen nicht möglich, weil die Anforderungen an die Fixierung im Hinblick auf Messung des fluoreszierenden Markerproteins einerseits und Messung des DNA-Inhalts der Zellen andererseits diametral entgegengesetzt waren und daher unvereinbar schienen. Die vorliegende Erfindung ermöglicht es erstmals, mit Hilfe eines geeigneten Fixierungsschritts beide Messungen in derselben Zellpopulation durchzuführen.

Um die geeigneten Fixierbedingungen zu ermitteln, wird zweckmäßig wie folgt vorgegangen: Zunächst werden die einerseits für die Messung der Fluoreszenz des Markerproteins (starke Fixierung) und andererseits die für die Messung des DNA-Gehaltes der Zellen (möglichst schwache Fixierung) optimalen Fixierbedingungen unabhängig voneinander ermittelt. Ausgehend von den

Bedingungen, mit denen die maximalen Meßwerte erhalten werden, werden die Fixierungsbedingungen hinsichtlich der Reagentien (Fixierungsreagens, Salze, Puffer), deren Konzentration sowie der Fixierungszeit so verändert, daß bei gleichzeitiger Vornahme beider Meßvorgänge die Effizienz möglichst wenig beeinträchtigt wird.

Bevorzugt wird die Primärfixierung mit Paraformaldehyd und die anschließende Behandlung (Sekundärfixierung/Permeabilisierung) mit Ethanol durchgeführt; diese Behandlung hat sich im Rahmen der durchgeführten Versuche als am besten geeignet erwiesen. Die Vorfixierung mittels 1 bis 4 % (w/v), insbesondere 2 % Paraformaldehyd findet in einer isotonischen, gepufferten Salzlösung statt. Geeignet sind z.B. Standardlösungen wie 100 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM Saccharose sowie handelsübliche physiologisch verträgliche Puffer.

Statt Paraformaldehyd können auch andere Reagenzien, wie sie üblicherweise, z.B. in der Immunhistochemie, eingesetzt werden verwendet werden. Beispiele für gängige Fixiermittel, die einschlägigen Handbüchern (27) entnommen werden können, sind Formaldehyd oder Chloroform/Aceton.

Statt Ethanol, das sich unter den in den durchgeführten Versuchen gewählten Bedingungen für die Sekundärfixierung im Anschluß an die Primärfixierung mit Paraformaldehyd als besonders geeignet erwiesen hat, können grundsätzlich andere Reagentien, die eine schwache Permeabilisierung der Zellmembran ermöglichen, verwendet werden, wie z.B. Detergentien.

Die transiente Expression von Genen, die Apoptose modulieren, zum Beispiel Bcl-Familienmitglieder oder Komponenten der Überlebensfaktor-Signaltransduktion, und die anschließende quantitative Analyse der Apoptose mittels der erfindungsgemäßen Methode erlauben es, chemische Verbindungen darauf zu testen, ob sie in der Lage sind, spezifisch die Funktion der Apoptose-modulierenden Gene zu beeinflussen.

Die erfindungsgemäße Methode kann durch entsprechende apparative Anpassungen, z.B. der Probenpräparation und der FACS-Analyse, automatisiert werden, was sie für Messungen im großen Maßstab, z.B. in High Throughput Screening-Methoden, geeignet macht.

Die Methode in dieser Form findet Anwendung bei der Identifizierung pharmazeutisch wirksamer Substanzen, die Apoptose in Abhängigkeit der Expression bestimmter Gene (Apoptose-Testgene) modulieren können. Dabei wird das Gen, dessen Wirkung auf Apoptose durch die Testsubstanz moduliert werden soll, transient in Testzellen transfiziert und die Testzellen mit einer Testsubstanz aus einem Vorrat von Substanzen inkubiert. Die modulierende Wirkung einer Testsubstanz auf die Aktivität des Testgens wird direkt meßtechnisch erfaßt.

Derartige Methoden können für folgende Screening-Anwendungen eingesetzt werden:

a) Suche nach Inhibitoren von Überlebensfaktoren und ihrer Signaltransduktion, sowie Inhibitoren von anti-apoptotischen Genprodukten in Tumorzellen; b) Suche nach Chemikalien, die in Tumorzellen synergistisch mit Chemotherapie bestimmte Überlebensfaktoren und ihre Signaltransduktion inhibieren; c) Suche nach Chemotherapeutika, die mit der Inhibierung von Überlebensfaktoren synergistisch wirken.

In einer Ausführungsform wird die erfindungsgemäße Methode in einem Screeningverfahren verwendet, um die Wirkung von tumorzelleigenen Überlebensfaktoren (Rezeptorliganden wie IGF-I, IGF-II, FGFs (Fibroblast Growth Factors), PDGFs (Platelet Derived Growth Factors) auf die Apoptose zu untersuchen, wie sie durch die Aktivierung der entsprechenden Rezeptoren durch diese Faktoren und die darauffolgende Signalkaskade vermittelt wird. Das Assayverfahren kann in einem Screening eingesetzt werden, um die Wirkung natürlicher, bekannter oder gegebenenfalls noch zu identifizierender Überlebensfaktoren im Hinblick auf eine Tumorthherapie, im Zuge derer die Apoptose von Tumorzellen verstärkt werden soll, zu modulieren. Ziel eines solchen Verfahrens ist es vor allem, Substanzen zu identifizieren, die bezüglich der Apoptose synergistisch mit der Inhibierung von tumorspezifischen Überlebensfaktoren wirken.

Um derartige Wirksynergismen zu ermitteln, kann wie folgt vorgegangen werden:

Es werden, ausgehend von Tumorzellen, Testzellen hergestellt, in denen die Überlebensfaktorfunktion inhibiert wird, indem in die Zellen DNAs, kodierend für dominant-negative Versionen von Rezeptoren der Überlebensfaktoren oder für dominant-negative Signalübertragungsmoleküle solcher Rezeptoren eingeführt und exprimiert werden. Beispiele für Rezeptoren sind der IGF-1-Rezeptor (29), FGF-Rezeptoren (30), PDGF-Rezeptoren (31), Rezeptoren der EGF-Wachstumsfaktoren (32; EGF-Rezeptor,

Her-2/neu/ErbB-2, ErbB-3, ErbB-4). Beispiele für Signalübertragungsmoleküle sind Ras, Raf, Phosphoinositol(3)Kinase (=PI(3)-Kinase), MAP-Kinasen, Proteinkinase TypB und TypC, Phospholipase C, ferner Adaptormoleküle wie Shc, Grb-2 (33; 34; 35; 36; 37).

Geeignete Rezeptormutanten sind dadurch charakterisiert, daß die funktionellen Domänen des Rezeptors derart modifiziert sind, daß der Rezeptor zwar den Liganden bindet, aber diese Bindung nicht mehr in der Aktivierung der Signalkaskade resultiert. Im Fall des IGF-1R handelt es sich bei der Modifikation um das vollständige Fehlen der Rezeptorkinasedomäne oder um eine Mutation der ATP-Bindungsstelle (28).

Signalübertragungsmoleküle können verändert werden, indem die für die Übermittlung des Signals notwendige Domäne, z.B. die katalytische Domäne eines Enzyms oder die Proteinbindungsstelle eines Adaptormoleküls, durch Mutation inaktiviert wird.

Die für den Einsatz in einem Screen vorgesehenen Mutanten werden in Vorversuchen auf ihre apoptoseinduzierende bzw. -verstärkende Wirkung in Testzellen (z.B. Fibroblastenzelllinien, die durch Transfektion mit dem jeweiligen Wildtyp-Rezeptor faktorabhängig gemacht wurden) nach gängigen Methoden in Serienversuchen optimiert, indem die Mutanten in die Testzellen transfiziert werden und das Ausmaß der Apoptose der Testzellen mittels der erfindungsgemäßen Methode gemessen wird. Die jeweiligen funktionellen Domänen der Mutanten werden erforderlichenfalls mittels gängigen molekularbiologischen Methoden weiter

verändert, bis eine optimale Inhibierung des Wildtyprezeptors und seiner darauffolgenden Signalübertragung und damit ein maximales Ausmaß an Apoptose der Testzellen erreicht wird.

Im Screen werden die Testzellen mit bekannten Chemotherapeutika oder mit Substanzen aus einem Pool, die hinsichtlich ihrer potentiellen chemotherapeutischen Wirkung untersucht werden sollen, inkubiert und die Wirkung auf Apoptose mit der erfindungsgemäßen Methode untersucht. Insbesondere ist es Ziel eines solchen Screens, eine synergistische Wirkung zwischen der Inhibierung bzw. dem Fehlen der Überlebensfaktorfunktion in Tumorzellen und bekannten Chemotherapeutika oder potentiell chemotherapeutisch wirksamen Substanzen zu ermitteln.

Um mit dem Screeningverfahren Substanzen zu finden, die den Synergismus mit der Inhibierung der Überlebensfaktorfunktion spezifisch für bestimmte Tumorarten aufweisen, können in einem parallelen Screening Testzellen, die von unterschiedlichen Tumorarten abgeleitet sind, unter ansonsten identischen experimentellen Bedingungen eingesetzt werden.

Als Kontrollzellen für die Spezifität der synergistischen Wirkung zwischen dem Fehlen der Überlebensfaktorfunktion und der Chemotherapie werden Zellen verwendet, denen natürlicherweise diejenige Überlebensfaktorfunktion fehlt, deren Inhibierung im Assay ermittelt werden soll.

Es ist jedoch grundsätzlich auch möglich, nach Substanzen zu suchen, die die Wirkung von apoptoseinduzierenden oder -verstärkenden Molekülen erhöhen. Beispiele dafür sind Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie (TNF-Rezeptoren, Fas) und Moleküle ihrer Signalübertragungswege (Caspasen). Das Testprinzip ist identisch wie für die apoptosehemmenden Überlebensfaktoren, mit dem Unterschied, daß Wildtyp- oder konstitutiv aktive Versionen dieser Apoptosemoleküle in den Tumorzellen exprimiert werden.

Schwerpunkt der Anwendung in Screeningverfahren ist somit die Suche nach Synergismen, die zu einer Verstärkung der Tumorzellapoptose führen. Damit wird die Voraussetzung für Therapieansätze geschaffen, in denen bei gleichzeitiger Inhibierung der Tumorzellüberlebensfunktion die Dosis von Chemotherapeutika signifikant reduziert werden kann, ohne den Therapieerfolg zu beeinträchtigen. Die Herabsetzung der chemotherapeutischen Dosis bringt für den Patienten entscheidende Vorteile, weil dadurch die toxischen Begleiterscheinungen der Chemotherapie stark vermindert werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde mit Hilfe der erfindungsgemäßen Methode untersucht, ob das durch den Überlebensfaktor IGF-II vermittelte Signal, welches das Überleben von  $\beta$ -Tumorzellen bewirkt, durch den IGF-Rezeptor übermittelt wird. Zu diesem Zweck wurde eine dominant-negative Version des humanen IGF-1 Rezeptors (dnIGF-1R), die eine Aminosäuresubstitution in der ATP-Bindungsstelle (28) aufweist, transient in



Wildtyp- $\beta$ -Tumorzellen mit einem das Green Fluorescence Protein tragenden Plasmid (eGFP) co-transfiziert. Die Zellen wurden daraufhin mit apoptotischen Stimuli und/oder Wachstumsfaktoren inkubiert, geerntet, fixiert und mit Propidiumjodid gefärbt, um den DNA-Gehalt zu bestimmen. Mittels FACS Analyse wurden transfizierte, eGFP exprimierende einzelne Zellen nachgewiesen und in dieser Population die apoptotischen Zellen durch ihren DNA-Gehalt von weniger als 2 N identifiziert. Es zeigte sich, daß die Transfektion mit Plasmiden, die für den dnIGF-1R kodieren, einen dramatischen Anstieg der Apoptose sowohl in unbehandelten als auch in mit Daunomycin oder Etoposid behandelten Wildtyp- $\beta$ -Tumorzellen zur Folge hat. Es wurde festgestellt, daß dnIGF-1R die Apoptose in  $\beta$ -Tumorzellen beinahe mit derselben Effizienz verstärkt wie das Adenovirus-E1A-Protein, eines der potentesten apoptoseinduzierenden Genprodukte überhaupt. Somit konnte mit Hilfe der erfindungsgemäßen Assaymethode gezeigt werden, daß Tumorzellen auf apoptotische Stimuli empfindlicher reagieren, wenn die IGF-1R-Signalübertragung unterbrochen ist und daß sie, ähnlich wie IGF-II-defiziente Tumorzellen, eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika aufweisen.

Ferner können mit der erfindungsgemäßen Methode bekannte Gene daraufhin untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß sie Apoptose in unterschiedlichen Zelltypen modulieren.

Eine weitere Anwendung der erfindungsgemäßen Methode ist die Expressionsklonierung von Genen, die Apoptose modulieren. Dafür wird eine komplette cDNA-

Expressionsbibliothek transient in Zellen transfiziert. Die erfindungsgemäße Methode ist in der Lage, den Einfluß von Genexpression innerhalb 24 bis 48 Stunden zu messen. Es ist daher möglich, Zellen zu analysieren und noch lebend zu isolieren. Für diese Anwendung wird eine Modifikation der Methode vorgenommen, indem Einzelzellen, die von einem zu bestimmenden Apoptosehintergrund abweichen, durch FACS-Sortierung isoliert werden. Die in diese Zellen transfizierten Plasmide werden isoliert, amplifiziert und in weiteren Transfektionsrunden selektioniert. Plasmide, die ein Apoptose-modulierendes Gen enthalten, werden auf diese Weise isoliert. Die entsprechenden Gene werden dann durch Sequenzierung und weitere Expressions- und Funktionsstudien charakterisiert.

Um die erfindungsgemäße Methode zu validieren, wurden im Beispiel 1 zunächst etablierte Tumorzelllinien verwendet, die einerseits mit einem GFP-Plasmid, und andererseits mit einem Plasmid, enthaltend eine pro-apoptotische oder eine anti-apoptotische Gensequenz, oder einem Kontroll-Plasmid transfiziert wurden. Anschließend an die Transfektion wurden die Zellen nach einer Ruhepause mit einem apoptotischen Stimulus behandelt (Kontrollzellen blieben unbehandelt). Anschließend wurden die abgelösten Zellen gesammelt und mit den trypsinierten adherenten Zellen vereinigt, gewaschen und fixiert. Nach dem anschließenden Waschen wurden die Zellen geteilt, um einen Vergleich der erfindungsgemäßen Methode mit der herkömmlichen TUNEL-Methode, die fluoreszierendes Cy5-dCTP (5-Amino-propargyl-2'-Deoxycytidin 5'-Triphosphat gekoppelt an Cy5 Fluoreszenzfarbstoff ) verwendet, zu ermöglichen.

Es zeigte sich, daß die erfindungsgemäße Methode verläßlich den erwarteten pro- oder anti-apoptotischen Effekt der Genprodukte nachweist und daß der Zusatz des apoptotischen Stimulus den beobachteten Effekt verstärkt. Wenngleich die Empfindlichkeit der erfindungsgemäßen Methode unter den gewählten Bedingungen etwas geringer war als die der TUNEL-Methode, war der normalisierte Apoptose-Wert, ausgedrückt als das Verhältnis der mit dem pro-apoptotischen Gen erzielten maximalen Apoptosewerte des jeweiligen Assays, nahezu identisch. Gegenüber der TUNEL-Methode weist die erfindungsgemäße Methode den Vorteil der Schnelligkeit, Einfachheit und Billigkeit auf.

Die breite Anwendbarkeit sowie Verläßlichkeit der erfindungsgemäßen Methode wurde durch Verwendung einer nicht-transformierten Ratten-Fibroblasten-Zelllinie, die weniger auf apoptotische Stimuli reagiert als die etablierten Tumorzelllinien, bestätigt.

Die erfindungsgemäße Methode ermöglicht es, rasch, wirkungsvoll und reproduzierbar die potentielle Rolle eines Genprodukts in der Apoptose festzustellen.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt einen Kit zur einfachen und routinemäßigen Durchführung des Verfahrens.

Ein solcher Kit enthält zweckmäßig in mehreren getrennten Behältern folgende Komponenten:

- a) eine oder mehrere für die Transfektion erforderliche Komponenten;

- b) ein Plasmid, enthaltend die für das fluoreszierende Markerprotein kodierende Sequenz;
- c) einen Leervektor für die Inserierung der interessierenden DNA Sequenz sowie für Kontrollmessungen;
- d) die Primärfixierlösung, z.B. Paraformaldehyd-Lösung;
- e) die Nachfixier/Permeabilisierungslösung, z.B. 70 % Ethanol;
- f) Waschlösung(en);
- g) einen DNA-bindenden Farbstoff.

Vorzugsweise enthält der Kit als Transfektionskomponenten Polyethylenimin und Psoralen/UV- inaktiviertes Adenovirus.

#### Beispiel 1

Für dieses Beispiel wurden etablierte Tumorzelllinien ( $\beta$ TC und  $\beta$ HC) verwendet, die von  $\beta$ -Zell-Tumoren (15) transgener Mäuse stammen, in denen die regulatorische Region des Insulin-Gens (Rip) die Expression des großen T-Antigens von Simianvirus 40 (Tag) in den  $\beta$ -Zellen pankreatischer Inseln spezifisch induziert (16).

Ca. 80.000 Zellen wurden in eine Vertiefung von 6 cm einer Kulturschale mit 6 Vertiefungen gesät und in DMEM, ergänzt mit 10 % FCS (v/v), 2 mM Glutamin, 100 internationalen Einheiten Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin, bis zu einer Konfluenz von 70 % gezüchtet. Die Zellen wurden mit 1  $\mu$ g eines Plasmids, kodierend für eGFP („enhanced GFP“; pEGFP-C1; Clontech) zusammen mit 1  $\mu$ g eines Kontrollplasmids (pMEX; (22)), eines pCMV-Plasmids, enthaltend das pro-apoptotische

Adenovirus-Gen ElA oder eines pCMV-Plasmids, enthaltend das anti-apoptotische Adenovirus-Gen ElB-19K (17, 18) unter Verwendung von 10 µl LipofectAMINE (GIBCO-BRL) nach Empfehlung des Herstellers transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen 16 h in komplettem Medium ruhen gelassen, anschließend wurden die Zellen entweder unbehandelt gelassen oder mit einem apoptotischen Stimulus (800 ng/ml Staurosporin; Sigma) (19, 20) während weiterer 16 h behandelt. 32 h nach der Transfektion wurden die abgelösten Zellen mit trypsinierten, adherenten Zellen vereinigt, zweimal mit 4 ml PBS gewaschen und bei Raumtemperatur während 30 min fixiert (2 % Paraformaldehyd, 100 mM NaCl, 300 mM Saccharose, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure), 10 mM PIPES (piperazine-N<sub>1</sub>N<sup>1</sup>-bis[z-ethane sulfonic acid]) pH 6.8). Dann wurde zweimal mit 4 ml PBS gewaschen und 14 h lang in eiskaltem 70 % EtOH nachfixiert.

Nach der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit 4 ml PBS gewaschen und geteilt. Eine Hälfte der Probe wurde mit RNase A (Sigma, St. Louis, USA) (50 µg/ml) in PBS während 30 min behandelt, zweimal mit 4 ml PBS gewaschen und 30 min vor der FACS-Analyse mit Propidiumjodid in PBS (PI; 50 µg/ml; Sigma, St. Louis, USA) gefärbt. Die andere Hälfte der Probe wurde mit 50 µl TdT-Reaktionsmischung (terminale Desoxynukleotidyltransferase; Boehringer Mannheim; 200 mM Kaliumkacodylat, 25 mM Tris-HCl pH 6.6, 0.25 mg/ml Rinderserumalbumin, 1 mM CoCl<sub>2</sub>; 0.25 nmol FluoroLink Cy5AP3-dCTP [Amersham], 12.5 Einheiten TdT) 1 h lang bei 37°C inkubiert, zweimal mit 4 ml PBS gewaschen, mit RNase in PBS (50 µg/ml) während 30 min behandelt, zweimal mit 4 ml HBS gewaschen (ab diesem Schritt wurde statt PBS HBS verwendet, weil DAPI in PBS

dazu neigt, Mikropräzipitate zu verursachen), mit DAPI in HBS (10 µg/ml; Sigma) während 20 min gefärbt und auf einem Becton Dickinson FACS Vantage Gerät analysiert. Die FACS Analyse der PI-gefärbten Zellen wurde mit einem Becton Dickinson FACScan Gerät durchgeführt, das mit einem sog. "doublet discrimination module" ausgestattet ist, mit dem Zellaggregate mittels Berechnung der Pulsweite und Pulsweite diskriminiert werden. Das Ergebnis der Versuche ist in Fig. 1 dargestellt. Fig. 1A zeigt die Anzahl der apoptotischen  $\beta$ HC 13T Tumorzellen (% Apoptose) in der gesamten eGFP-positiven Zellpopulation. Die schwarzen Balken zeigen die Bestimmung des sub-2N DNA Gehalts (GFP/PI); die weißen Balken den Einbau von fluoreszentem Cy5AP3-dCTP während der TdT-Reaktion (GFP/TUNEL). Die Zugabe von Staurosporin ist angegeben. Es wurde eine Anregungswellenlänge von 488 nm für eGFP und PI, eine Anregungswellenlänge von 647 nm für Cy5 und UV eines Wellenlängenbereichs von 51 - 364 nm für DAPI verwendet. Die Emissionsfluoreszenz wurde unter Verwendung eines 530/20 nm Schmalbandfilters für eGFP, eines 610 nm Sperrfilters für PI, eines 675/20 nm Schmalbandfilters für Cy5 und eines 424/44 Schmalbandfilters für DAPI gesammelt. Dupletten wurden mittels gepulster Prozessierung ausgeschlossen. eGFP-exprimierende Zellen wurden ausgewählt und auf Cy5- oder PI-Fluoreszenz analysiert. Die Daten wurden unter Verwendung der CELLQuest-Software (Becton Dickinson) analysiert. Jeder Balken stellt den Durchschnitt von 3 Transfektionen dar, Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken angezeigt. Jede Messung umfaßte 40.000 Gesamtereignisse, ausgewählt nach Größe und Einzelzellen. Die Transfektionseffizienz betrug 20-30 %.

Fig. 1B zeigt den normalisierten Prozentsatz der Apoptose für die verschiedenen Konstrukte. Apoptoseindex wurde unter Verwendung folgender Funktion normalisiert:  $(\% \text{ Apoptose in X} / \% \text{ Apoptose in eGFP-C1/E1A}) \times 100$ . Der apoptotische Index wurde für jede der verwendeten Nachweismethoden und für jede Nach-Transfektionsbehandlung (+/- Staurosporin) normalisiert.

### Beispiel 2

In diesem Beispiel wurde einer nicht-transformierte Ratten-Fibroblasten-Zelllinie der Bezeichnung Rat1A verwendet. Die Zellen wurden transient transfiziert, wobei entweder, wie in Beispiel 1 beschrieben, LipofectAMINE oder Polyethylenimin(PEI 2000)-DNA-Adenovirus-Komplexe (WO 93/07283) verwendet wurden. Im übrigen wurde hinsichtlich Behandlung der Zellen und Bestimmung der Apoptose mittels erfindungsgemäßem Verfahren einerseits und TUNEL-Methode andererseits genauso vorgegangen, wie in Beispiel 1 beschrieben. Der Vergleich der verschiedenen Transfektionsmethoden und Apoptose-Meßmethoden ist in der Tabelle dargestellt. Jeder Wert stellt den Durchschnitt von 3 Transfektionen dar; die Standardabweichung ist angegeben (s.d.). Die Effizienz bei der Transfektionsmethoden betrug 25-30 %.

### Beispiel 3

In diesem Beispiel wurden Wildtyp- $\beta$ -Tumorzellen (15) verwendet. Das verwendete dominant-negative IGF-1 Rezeptorkonstrukt, das unter der Kontrolle des CMV-Promotors steht und in dem das Codon 1003 in der ATP-Bindungsstelle von Lysin zu Alanin mutiert ist,

wurde von (28) beschrieben. Wie in den vorigen Beispielen beschrieben, wurden Wildtyp- $\beta$ -Tumorzellen bei einer Dichte von 80.000 Zellen in Triplikaten in Kulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen co-transfiziert mit pEGFP-C1 und einem Kontrollplasmid (Fig. 2: pMEX/ctr) oder mit pEGFP-C1 und einem Expressionsplasmid, kodierend entweder für Adenovirus-E1A (Fig. 2: E1A), Adenovirus-E1B-19K (Fig. 2: E1B-19K) oder den dominant-negativen IGF-1R. 36 h nach der Transfektion wurde Daunomycin (Fig. 2: schraffierte Balken) oder Etoposid (Fig. 2: weiße Balken) zum Kulturmedium in einer Konzentration von 1  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M gegeben. Transfizierte, aber unbehandelte Zellen werden in Fig. 2 durch schwarze Balken dargestellt. 12 h nach Daunomycin- bzw. Etoposid-Behandlung wurden die Zellen geerntet, fixiert und mit Propidiumjodid behandelt, wie in den vorigen Beispielen beschrieben. Die Bestimmung der apoptotischen Zellen wurde ebenfalls nach den oben beschriebenen Methoden durchgeführt. Für jede Messung wurden 40.000 Ereignisse gesammelt; die Transfektionseffizienz betrug 25-30 %. Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt.



Tabelle

Transfi- ziertes Konstrukt	LipofectAMINE			
	Propidium Jodid		TUNEL	
	% Apoptose (s.d.)	% Apoptose normalisiert	% Apoptose (s.d.)	% Apoptose normalisiert
pMEX (Ctr)	3.3 (0.7)	68.8	6.5 (0.6)	71.4
pE1B-19K	1.4 (0.3)	29.2	2.2 (0.5)	24.2
pE1A	4.8 (0.4)	100	9.1 (2.6)	100
	PEI / Adeno			
pMEX (Ctr)	1.2 (0.2)	52.2	7.5 (0.3)	52.1
pE1B-19K	0.7 (0.1)	30.4	5.2 (0.8)	36.1
pE1A	2.3 (0.6)	100	14.4 (2.7)	100

## Literatur

1. Korsmeyer, S. J. (1995) *Trends Genet*, **11**(3), 101-105.
2. Chinnaiyan, A. M. and Dixit, V. M. (1996) *Current Biology*, **6**(5), 555-562.
3. Vaux, D. L. and Strasser, A. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(6), 2239-2244.
4. White, E. (1996) *Genes Dev*, **10**(1), 1-15.
5. Kerr, J. F. R., Gobe, G. C., Winterford, C. M. and Harmon, B. V. (1995) In Schwartz, L. M., and Osborne, B. A. (eds.), *Cell Death*. Academic Press, Inc., San Diego, Vol. **46**, pp. 1-27.
6. McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R. J., Nishioka, W. K. and Green, D. R. (1995) In Schwartz, L. M., and Osborne, B. A. (eds.), *Cell Death*. Academic Press, Inc., San Diego, Vol. **46**, pp. 153-185.
7. Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T. and van Oers, M. J. (1994) *Blood*, **84**(5), 1415-1420.
8. Wyllie, A. H. (1980) *Nature*, **284**, 555-556.
9. Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. (1992) *J Cell Biol*, **119**, 493-501.
10. Cormack, B. P., Valdivia, R. H. and Falkow, S. (1996) *Gene*, **173**, 33-38.
11. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. and Riccardi, C. (1991) *J Immunol Meth*, **139**, 271-279.
12. Telford, W. G., King, L. E. and Fraker, P. J. (1991) *Cell Prolif*, **24**, 447-459.

13. Telford, W. G., King, L. E. and Fraker, P. J. (1992) *Cytometry*, **13**(2), 137-143.
14. Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P. and Traganos, F. (1992) *Cytometry*, **13**(8), 795-808.
15. Radvanyi, F., Christgau, S., Baekkeskov, S., Jolicoeur, C. and Hanahan, D. (1993) *Mol Cell Biol*, **13**, 4223-4232.
16. Hanahan, D. (1985) *Nature*, **315**, 115-121.
17. White, E., Cipriani, R., Sabbatini, P. and Denton, A. (1991) *J Virol*, **65**, 2968-2978.
18. White, E. and Cipriani, R. (1990) *Mol Cell Biol*, **10**, 120-130.
19. Jacobsen, M. D., Weil, M. and Raff, M. C. (1996) *J Cell Biol*, **133**, 1041-1051.
20. Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y. and Jacobson, M. D. (1993) *Science*, **262**, 695-700.
21. Baker, A., et al., (1997) *Gene Therapy*, **4**, 773-782
22. Martin-Zanca, D., et al., (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 24-33
23. Reed, J.C. (1997) *Nature*, **387**, 773-776
24. Villa, P., Kaufmann, S.H. und Earnshaw, W.C., (1997) *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 388-393
25. Ormo, M., et al., (1996) *Science*, **273**, 1392-1395
26. Living Colors pEBFP Vector (1997) *CLONTECHniques*, **XII**, 16-17
27. Light microscopy biology a practical approach. Alan J. Lacey (Hrsg.), IRL Press 1989, Kap. 4, 103-136
28. Kato, H., et al., 1993, *J. Biol. Chem.* **268**, 2655-2661
29. Baserga, R., et al., 1997, *Biochem. Biophys. Acta*, **1332**, F105-F126
30. Partanen, J., et al., 1992, *Progr. Growth Factor Res.* **4**, 69-83

31. Heldin, C.-H., 1995, Cell **80**, 213-223
32. Peles, E. und Yarden, Y., 1993, Bioessays **15**, 815-824
33. Pawson, T., 1995, Nature **373**, 573-580
34. Downward, J., 1994, Nature **371**, 379
35. Divechia, N. und Irvine, R.F., 1995, Cell **80**, 269-278
36. Franke, T.F., et al., 1997, Cell **88**, 435-437
37. Pritchard, C. und McMahon, M., 1997, Nature Genetics **16**, 214-215

## Patentansprüche

- 1) Verfahren zur Messung von Apoptose, dadurch gekennzeichnet, daß man
  - A) eine Population von Säugetierzellen transient transfiziert
    - ai) mit einem Plasmid, enthaltend eine interessierende DNA-Sequenz, von der bestimmt werden soll, ob sie bzw. das davon exprimierte Polypeptid eine pro- oder anti-apoptotische Wirkung hat,
    - aii) oder mit einem Plasmid, enthaltend eine interessierende DNA-Sequenz, von der bestimmt werden soll, ob bzw. durch welche Substanzen ihre pro- oder anti-apoptotische Wirkung bzw. die Wirkung des davon exprimierten Polypeptids modulierbar ist,
  - b) und mit einem Plasmid, enthaltend eine für ein fluoreszierendes Markerprotein kodierende DNA,
- B) die Zellen in einem geeigneten Nährmedium solange inkubiert, bis die interessierende DNA-Sequenz bzw. das exprimierte Polypeptid seine potentielle Wirkung auf die Apoptose ausgeübt hat,
- C) die Zellen erntet und fixiert, so daß das fluoreszierende Protein in den Zellen verbleibt, während die bei der Apoptose entstehenden DNA-Fragmente aus den Zellen diffundieren können,

- D) mittels Messung des DNA-Gehalts den Anteil der apoptotischen Zellen bestimmt,
  - E) mittels Messung der Zellen mit fluoreszierenden Markerprotein den Anteil der transfizierten Zellen bestimmt,
  - F) und durch Vergleich der in Schritt D und E erhaltenen Werte den Anteil der apoptischen Zellen in der transfizierten Subpopulation der Zellen bestimmt.
- 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Transfektion der Zellen mit Polyethylenimin und inaktiviertem Adenovirus durchführt.
  - 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das in A b) definierte fluoreszierende Polypeptid das Green Fluorescent Protein ist.
  - 4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man den DNA-Gehalt mit einem DNA-bindenden Farbstoff mißt.
  - 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff Propidiumjodid ist.
  - 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man die Inkubation gemäß Schritt B) in Gegenwart einer Testsubstanz vornimmt.

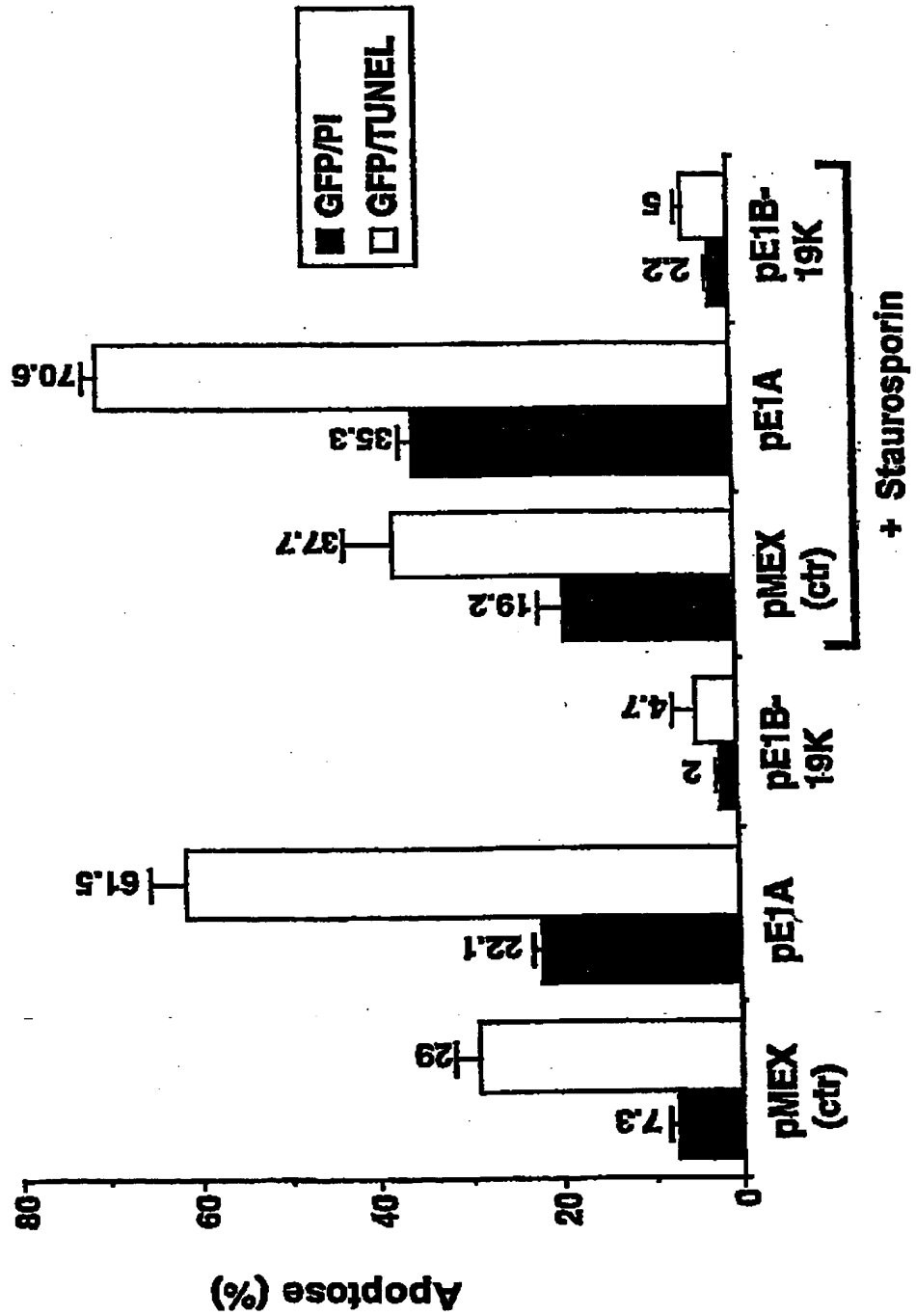
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Inkubation gemäß Schritt B) in Gegenwart einer Substanz vornimmt, die Apoptose stimuliert.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Primärfixierung in Schritt C mit Paraformaldehyd und die Sekundärfixierung/Permeabilisierung der Zellen mit Ethanol vorgenommen wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt D und E definierten Messungen in einem Schritt mittels fluoreszenzaktivierter Durchflußzytometrie-Analyse durchgeführt werden.
10. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er in mehreren getrennten Behältern folgende Komponenten enthält:
  - a) eine oder mehrere für die Transfektion erforderliche Komponenten;
  - b) ein Plasmid, enthaltend die für das fluoreszierende Markerprotein kodierende Sequenz;
  - c) einen Leervektor für die Inserierung der interessierenden DNA-Sequenz sowie für Kontrollmessungen;
  - d) die Primärfixierlösung;
  - e) die Sekundärfixier/Permeabilisierungslösung;

- f) Waschlösung(en);
  - g) einen DNA-bindenden Farbstoff.
11. Kit nach Anspruch 10, enthaltend als Komponente a) Polyethylenimin und Psoralen/UV-inaktiviertes Adenovirus.
  12. Kit nach Anspruch 10, enthaltend als Komponente b) ein für Green Fluorescent Protein kodierendes Plasmid.
  13. Kit nach Anspruch 10, enthaltend als Komponenten d) eine ca. 2%ige Paraformaldehydlösung und als Komponente e) ca. 70 % Ethanol.
  14. Verwendung des Verfahrens nach Anspruch 1 zum Identifizieren von Substanzen, welche die pro- oder anti-apoptotische Wirkung von Genen oder Genprodukten modulieren.
  15. Verwendung nach Anspruch 14 zum Identifizieren von therapeutisch wirksamen Substanzen, die eine synergistische Wirkung mit der Inhibierung bzw. dem Fehlen der Überlebensfaktorfunktion von Tumorzellen aufweisen, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Tumorzellen sind, daß die DNA-Sequenz gemäß aii) eine dominant-negative Version eines Rezeptors für einen tumorzelleigenen Überlebensfaktor oder eines Signalübertragungsmoleküls eines solchen Rezeptors ist und daß die Zellen in Gegenwart der Testsubstanz inkubiert werden.

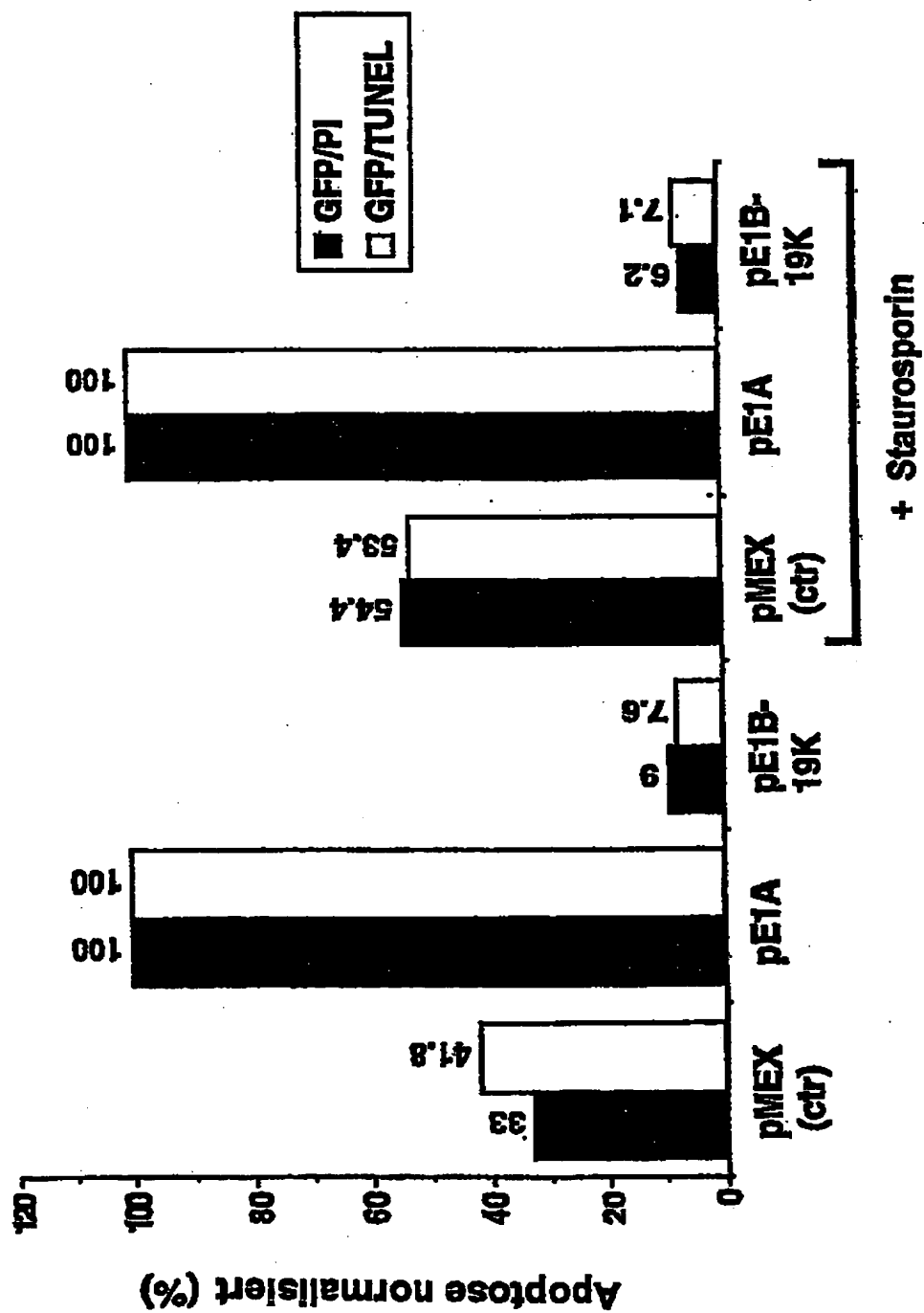


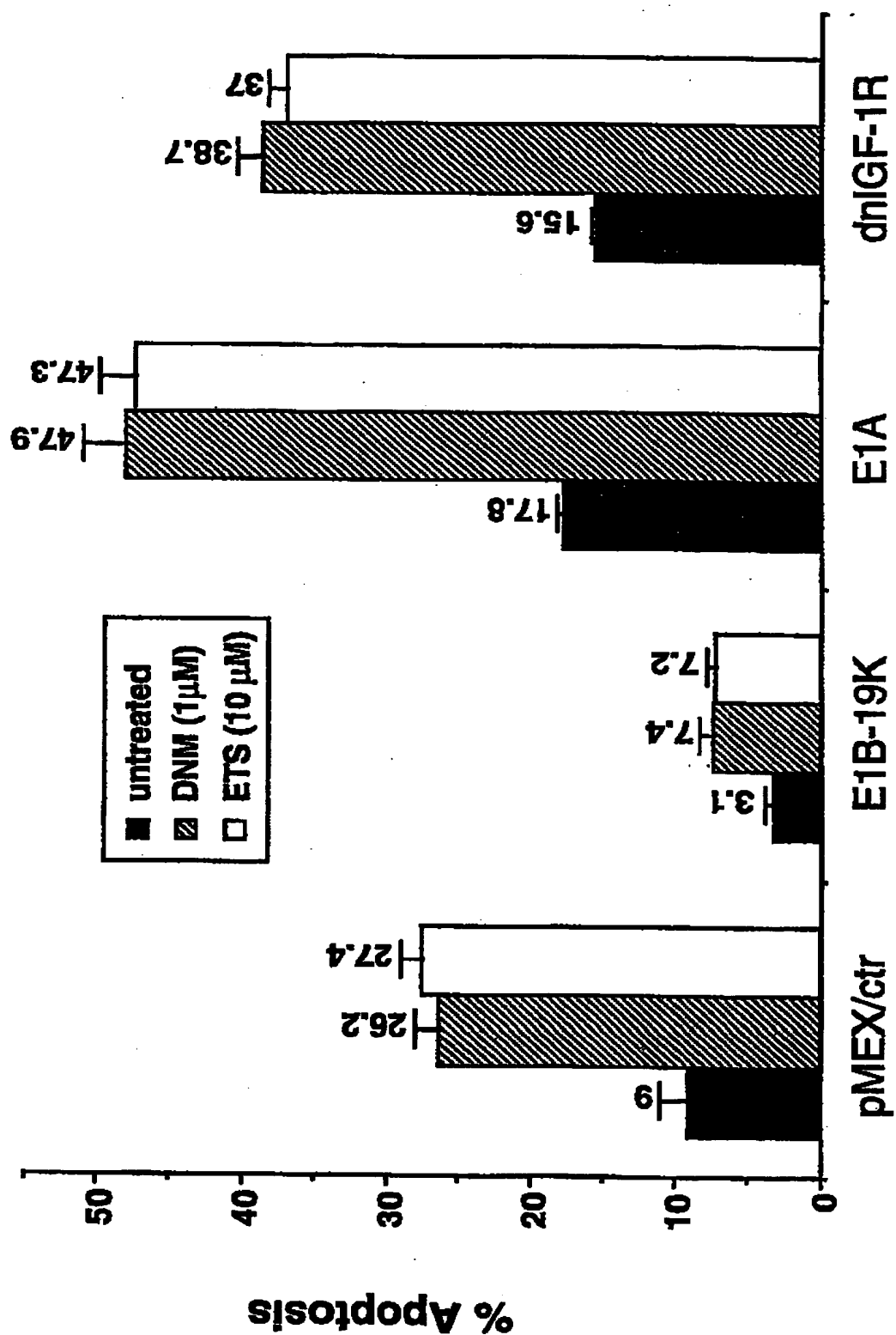
16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz gemäß aii) eine dominant-negative Version des IGF-1-Rezeptors ist.
17. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz gemäß aii) eine dominant-negative Version eines FGF-Rezeptors ist.
18. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz gemäß aii) eine dominant-negative Version eines PDGF-Rezeptors ist.

1/3  
Fig. 1 A



A

2/3  
Fig. 1 B**B**

3/3  
Fig. 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Patent Classification No.

PCT/EP 98/07682

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C12Q1/68 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BAKER A AND COTTEN M: "Delivery of bacterial artificial chromosomes into mammalian cells with psoralen-inactivated adenovirus carrier" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 25, no. 10, 25 May 1997, pages 1950-1956, XP002081200 see the whole document	1-18
A	CHRISTOFORI G. ET AL.: "A second signal supplied by insulin-like growth factor II in oncogene-induced tumorigenesis" NATURE, vol. 369, - 2 June 1994 pages 414-418, XP002097209 see the whole document	1-18

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 March 1999

Date of mailing of the international search report

01/04/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Int. Classification No.  
PCT/EP 98/07682

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>LAMM G. ET AL.,: "A rapid, quantitative and inexpensive method for detecting apoptosis by flow cytometry in transiently transfected cells"</p> <p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 25, no. 23, - 1 December 1997 pages 4855-4857, XP002097210 see the whole document</p>	1-18
P,X	<p>LAMM G. &amp; CHRISTOFORI G. : "Impairment of survival factor function potentiates chemotherapy-induced apoptosis in tumor cells"</p> <p>CANCER RESEARCH, vol. 58, - 15 February 1998 pages 801-807, XP002097211 see whole doc. esp. M&amp;M, and figures</p>	1-18

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12Q1/68 G01N33/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RESEARCHIERTE GEBIETE**

Researchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q G01N

Researchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BAKER A AND COTTEN M: "Delivery of bacterial artificial chromosomes into mammalian cells with psoralen-inactivated adenovirus carrier" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 25, Nr. 10, 25. Mai 1997, Seiten 1950-1956, XP002081200 siehe das ganze Dokument ---	1-18
A	CHRISTOFORI G. ET AL.: "A second signal supplied by insulin-like growth factor II in oncogene-induced tumorigenesis" NATURE, Bd. 369, - 2. Juni 1994 Seiten 414-418, XP002097209 siehe das ganze Dokument ---	1-18
-/--		



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Researchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. März 1999

Abmeldedatum des internationalen Researchenberichts

01/04/1999

Name und Postanschrift der internationalen Researchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, F

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	LAMM G. ET AL.: "A rapid, quantitative and inexpensive method for detecting apoptosis by flow cytometry in transiently transfected cells" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 25, Nr. 23, - 1. Dezember 1997 Seiten 4855-4857, XP002097210 siehe das ganze Dokument	1-18
P,X	LAMM G. & CHRISTOFORI G. : "Impairment of survival factor function potentiates chemotherapy-induced apoptosis in tumor cells" CANCER RESEARCH, Bd. 58, - 15. Februar 1998 Seiten 801-807, XP002097211 see whole doc. esp. M&M, and figures	1-18



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ ~~FADED TEXT OR DRAWING~~
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ ~~SKEWED/SLANTED IMAGES~~
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**